

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA**

**ANALISIS DEL RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS VIABLES
DE MUESTRAS DE PESCADO CONGELADO, INCUBADAS A 30 °C Y 35 °C Y SU
CORRELACION CON LOS RESULTADOS DE TRIMETILAMINA Y NITROGENO
BASICO VOLATIL TOTAL**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TITULO DE
MEDICO VETERINARIO.

KAREN JOCELYNNE MONTECINOS ABRIGO

VALDIVIA – CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Rafael Tamayo C

Nombre

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Mónica Sáez L.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

José de la Vega M.

Nombre

Firma

Rafael Burgos A.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

24 de Octubre de 2006

INDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS.....	11
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSION	15
7. BIBLIOGRAFIA	19
8. ANEXOS	25
9. AGRADECIMIENTOS.....	33

1. RESUMEN

Con el objetivo de determinar las diferencias estadísticas entre el registro de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas viables (RAM) incubadas a 30 °C y 35 °C de muestras de pescado congelado y su correlación con la producción de trimetilamina (TMA) y nitrógeno básico volátil total (NBVT), se analizaron los registros de 110 muestras de distintas especies (salmones 54,5%, trucha 30% y otros 15,5%), recolectadas entre Diciembre del 2001 y Agosto del 2005.

Las muestras seleccionadas contenían análisis de RAM a 30 °C y 35 °C, NBVT y TMA, pertenecientes a los registros del Laboratorio de Alimentos del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile.

Del total de las muestras analizadas un 99,82% tenían un recuento inferior a 10^6 ufc/g, nivel límite de aceptabilidad según exigencias y regulaciones chilenas lo que refleja frescura de las muestras. Luego de analizar estadísticamente el recuento de los microorganismos mesófilos incubadas a 30 °C y 35 °C, resultaron mayores los valores al realizar la incubación a 30 °C, siendo la diferencia observada estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para la misma muestra de pescado congelado. Además en promedio, a 35 °C se obtuvo un 24,98% del recuento realizado a 30 °C.

No se encontró correlación significativa ($p > 0,05$) entre el recuento de aerobios mesófilos (incubadas a 30 °C – 35 °C) y NBVT. Para la TMA y el recuento bacteriano se observó una correlación de 0,15 (la cual es significativa $p < 0,05$), por lo que no sería un buen indicador de calidad higiénica del pescado. No se observó correlación entre NBVT y TMA.

En conclusión, realizar la incubación a 35 °C sería la temperatura óptima para el recuento de microorganismos mesófilos, los cuales son de mayor interés en salud pública, mientras que a 30 °C además se evidenciaría la flora nativa del pescado.

Palabras claves: pescado, aeróbias mesófilas, NBVT, TMA.

2. SUMMARY

ANALYSIS OF THE AEROBIC MESOPHILIC COUNT OF FROZEN FISH SAMPLES, INCUBATED AT 30 °C AND 35 °C AND THEIR CORRELATION WITH THE TRIMETHYLAMINE AND TOTAL VOLATILE BASIC NITROGEN RESULTS.

With the objective to determine the statistical differences between the counts of the registration of viable aerobic mesophilic bacteria (RAM) incubated at 30 °C and 35 °C of frozen fish samples and their correlation with trimethylamine (TMA) and total volatile basic nitrogen (NBVT) production, there were analyzed the records of 110 samples of different species (salmons 54,5 %, trout 30 % and other 15,5 %), gathered between December, 2001 and August, 2005.

The selected samples contained analysis of RAM at 30 °C and 35 °C, NBVT and TMA, belonging to the registrations of the Laboratory of Foods of the Institute of Preventive Medicine Veterinary of the Universidad Austral de Chile.

The 99,82% of the analyzed samples had an inferior count to 10^6 ufc/g, level limit of acceptability according to requirements and Chilean regulations what reflects freshness gives the samples. After statistically analyzing the recount of the microorganisms mesophilic incubated at 30 °C and 35 °C, they were bigger the values when carrying out the incubation at 30 °C, being the observed difference is statistically significant ($p < 0,05$) for the same sample of frozen fish. On the average, at 35 °C it was obtained a 24,98% of the recount was obtained at 30 °C.

There was not significant correlation ($p > 0,05$) among the recount of aerobic mesophilic (incubated 30 °C – 35 °C) and NBVT. For the TMA and the bacterial recount was observed a correlation of 0,15 (which is significant $p < 0,05$), for what would not be a good indicator of hygienic quality of the fish. Correlation was not observed between NBVT and TMA.

In conclusion, to realize the incubation at 35 °C would be the good temperature for the recount of microorganisms mesophilic, which are of more interest in public health, while at 30 °C the native flora of the fish would also be evidenced.

Key words: fish, aerobic mesophilic, BVT, TMA.

3. INTRODUCCION

Cuando el pescado se deteriora, se vuelve no comestible más rápido que otros alimentos. A no ser que se consuma poco tiempo después de la muerte, se altera su calidad y por lo tanto puede perderse como alimento de valor nutritivo (FAO, 2001).

Ya que el pescado fresco es susceptible a temperatura ambiente a un deterioro rápido. La preservación de pescado en el hielo es una de las maneras eficaces de retardar el deterioro. Luego del almacenamiento en hielo, el mejor método de mantención es el congelamiento, en el cual algunas enzimas endógenas continúan ejerciendo cambios autolíticos en el pescado y por consiguiente el deterioro (Jay, 2000).

Otras técnicas de preservación y procesamiento están el tratamiento térmico (conservas, cocción y ahumado), reducción del agua disponible (secado, salado y ahumado) y cambios en el ambiente del almacenamiento (empaquete y refrigeración), que pueden bajar el ritmo al que se produce el deterioro y permitir así que el pescado se distribuya y comercialice en todo el mundo (FAO, 2001).

3.1. ELABORACION DEL PESCADO CONGELADO.

Para la elaboración del pescado congelado, el pescado fresco debe ser recibido en una cámara de almacenamiento a 0 °C, con el fin de conservar su frescura y evitar su descomposición para luego ser procesado, siendo en primer lugar descabezado y lavado eliminándose además la cola, vísceras, y todo el material que no reúne las condiciones de calidad requeridas. Luego el pescado se filetea y se separan las espinas y restos de piel. Continuando con lavado que permite remover restos de piel y partículas extrañas. Posteriormente debe ser envasado y almacenado. El pescado congelado se debe almacenar en una cámara a -20 °C (INTEC, 1998).

3.2. DETERIORO DEL PESCADO.

El deterioro del pescado se debe principalmente a dos factores, enzimas endógenas y bacterianas (Ellis y Silva, 1997; FAO, 1998). La singularidad de las enzimas, tejido muscular y la flora bacteriana se asocia a cada especie. Los metabolitos de la acción bacteriana y la degradación enzimática, indican la calidad de los pescados, según si son producidos naturalmente en el músculo o es de origen microbiano (Ellis y Silva, 1997). La actividad de las enzimas de origen bacteriano, se asocia mayormente con el proceso de deterioro del pescado proveniente del mar (FAO, 1998).

El deterioro o los cambios autolíticos son los que determinan las pérdidas iniciales de calidad en el pescado fresco, pero contribuyen muy poco al deterioro del pescado refrigerado o de sus productos refrigerados. Una excepción a esta afirmación es el rápido desarrollo de olores extraños y coloraciones por la acción de las enzimas

intestinales en ciertos pescados no eviscerados. No obstante, en el pescado congelado los cambios autolíticos son de gran importancia. Un ejemplo es la reducción del OTMA en pescado refrigerado, por un proceso bacteriano con formación de TMA. Estando inhibida la acción bacteriana en el pescado congelado y OTMA es descompuesto por la acción de enzimas autolíticas en DMA y FA (FAO, 1997).

El deterioro se evidencia por la detección de olores y sabores extraños, formación de exudados, producción de gases, pérdida de color y cambios de textura. El desarrollo de estas condiciones de deterioro en el pescado y sus productos se deben a la combinación de fenómenos microbiológicos, autolíticos y químicos (FAO, 1997).

3.2.1. Cambios microbiológicos (en hielo y congelación).

El músculo de un pez saludable o de un pescado recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias en el músculo (FAO, 1998). Cuando el pez muere, el sistema inmunológico colapsa y las bacterias proliferan libremente. En la superficie de la piel, las bacterias colonizan en una amplia extensión la base de las escamas. Durante el almacenamiento en hielo solo un número limitado de bacterias invaden el músculo penetrando entre las fibras musculares (Murray y Shewan, 1979). También en almacenamiento se desarrolla la flora característica, pero sólo una parte de esta flora contribuye al deterioro (FAO, 1997).

Aun cuando el número de bacterias en el pescado fresco es muy alto, muchas de estas bacterias no son importantes durante el deterioro (FAO, 1998), pero forman parte de la flora del deterioro, por que están presentes en el pescado deteriorado, siendo las bacterias específicas del deterioro (OED), el grupo que produce olores y sabores desagradables asociados al deterioro (Sikorski y Kolakowski, 2000). Constituyendo estos organismos solo la menor parte de la flora presente. Durante el almacenamiento en frío el porcentaje de las bacterias específicas del deterioro normalmente aumenta. El óxido de trimetilamina (OTMA) del músculo del pescado funciona como estimulante selectivo de crecimiento. Por lo que una gran parte de las bacterias presentes en el pescado deteriorado no desempeñan ningún papel en lo absoluto en el deterioro (FAO, 1988).

Cada producto pesquero posee sus propias bacterias específicas del deterioro y es el número de estas bacterias y no el número total de microorganismos, lo que guarda relación con la duración en almacén del producto (Dalgaard y col., 1993).

Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos de los peces vivos y recién capturados. El número total de microorganismos varía enormemente, se ha establecido como rango normal $10^2 - 10^7$ ufc (unidades formadoras de colonias)/cm² en la superficie de la piel (Liston, 1980). Las branquias e intestinos contienen entre 10^3 y 10^9 ufc/g (Shewan, 1962).

Muchas especies diferentes de bacterias pueden ser encontradas en la superficie de los peces. Las bacterias en peces de aguas templadas son clasificadas en psicrotróficas y psicrofílicas, de acuerdo al rango de su temperatura de crecimiento. Las psicrotróficas son bacterias capaces de crecer a 0 °C pero su óptimo es alrededor de los 25 °C. Las psicrofílicas son bacterias con una temperatura máxima de crecimiento alrededor de los 20 °C y su óptimo a 15 °C, creciendo también a 0 °C (Morita, 1975). En las aguas cálidas pueden aislarse un mayor número de mesófilos (temperatura óptima entre 30 °C y 40 °C) (FAO, 1998).

El deterioro del pescado cuando se almacena en congelación es principalmente resultado de las bacterias psicrotróficas que crece fácilmente y se multiplica a las temperaturas bajas (Shewan, 1977; Surendran y Gopakumar, 1981).

La microflora inicial del pescado es muy variada, aunque en aguas templadas está dominada por bacterias psicrofílicas Gram negativas, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* y *Flavobacterium*. Organismos Gram positivos (como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*) también pueden ser encontrados en distintas proporciones (Shewan, 1977). En aguas marinas, las más abundantes son aquellas bacterias dependientes de cloruro de sodio para su crecimiento, los géneros más importantes son *Alteromonas*, *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella* (Gram y col., 1990; Spanggaard y col., 1993; DiChristina y DeLong, 1994).

Los alimentos marinos son muy susceptibles al deterioro debido a la autólisis y crecimiento de poblaciones microbianas (Dainty y col., 1983). La actividad microbiana en los productos marinos produce olores pronunciados, acorta su vida útil, provocando por esto pérdidas económicas (Reddy y col., 1994).

Durante el almacenamiento en hielo, el crecimiento bacteriano es lento, por tanto el deterioro está dado principalmente por enzimas endógenas. Luego, el número de bacterias aumenta considerablemente, sin embargo el deterioro, no se debe a la cantidad de bacterias, sino a la actividad de las enzimas provenientes de un grupo de los OED que son las principales responsables de la pérdida de la calidad del producto (Sikorski y Kolakowski, 2000).

Sin embargo, no toda la flora bacteriana del pescado almacenado en hielo es la que produce olores y sabores desagradables asociados al deterioro, sino que son las antes mencionadas bacterias del deterioro (diferentes para cada producto pesquero) que guardan directa relación con los cambios microbiológicos y químicos durante el almacenamiento pasados los 8-10 días (FAO, 1998). Así, por ejemplo, durante el almacenamiento en hielo del pescado blanco fresco, la microflora dominante está compuesta por los géneros *Pseudomonas*,

Shewanella, *Moraxella* y *Acinetobacter*, siendo los géneros *Shewanella* y *Pseudomonas* organismos específicos del deterioro (FAO, 1988).

Las medidas sensoriales, químicas y los cambios físicos han mostrado que el deterioro de la calidad del pescado continúa en alguna magnitud durante el almacenamiento a temperaturas de congelación (Haard, 1992). La disminución de la calidad del pescado durante la congelación se ha atribuido a los cambios asociados con los lípidos y proteínas (Abdalla y col., 1989).

3.2.2. Cambios químicos y autólisis enzimática.

Los cambios químicos inducidos por el crecimiento bacteriano son principalmente la producción de componentes volátiles como la TMA, amoníaco (NH_3), compuestos sulfurosos volátiles, cetonas, ésteres e hipoxantina, además de otros compuestos de bajo peso molecular. Se ha demostrado que la mayoría de los componentes volátiles son producidos por bacterias (Shewan, 1962). Los sustratos para la producción de volátiles son los carbohidratos (como el lactato y la ribosa), los nucleótidos (como la inosina monofosfato y la inosina) y otras moléculas de nitrógeno no proteico (NNP). Los aminoácidos son sustratos particularmente importantes para la formación de sulfitos y amoníaco (FAO, 1998).

De estos, el más importante como índice de calidad del pescado en deterioro almacenado en hielo es la TMA (producto de la reducción del OTMA), compuesto que al aumentar produce el olor característico del pescado en deterioro (Gopakumar, 2000; Pons-Sánchez-Cascado y col., 2005).

La microflora del deterioro produce enzimas que causan proteólisis, desaminación y decarboxilación causando la acumulación de metabolitos desagradables y pérdida del sabor (Connell y Shewan, 1980; Sikorski, 1990; Sikorski y col., 1994; FAO, 1997). Estos cambios autolíticos están dados principalmente por catabolismo de nucleótidos, de carbohidratos, oxidación e hidrólisis de lípidos, alteraciones en las proteínas y otros compuestos nitrogenados (Liston y col., 1976).

En el pescado congelado el OTMA es reducido por las enzimas endógenas a dimetilamina (DMA) y formaldehído (FA) considerando que en el pescado fresco o en hielo es reducido por las enzimas bacterianas a trimetilamina (TMA) (Hebard y col., 1982; Lundstrom y Racicot, 1983; Veciana-Nogués y col., 1997). Durante la congelación, la autólisis está ligada principalmente a una enzima (OTMAasa u OTMAdimetilasa) que se encuentra en la mayoría de los pescados de agua de mar. La degradación del OTMA produce en almacenamiento en congelación el FA y DMA, inducido por la OTMAasa en cantidades equimolares (Parkin y Hultin, 1982; Lundstrom y Racicot, 1983; FAO, 1998; Sotelo y Rehbein, 2000).

La OTMAasa se ha encontrado en 30 especies de pescados de 10 familias, la mayoría de los grupos en que los productos de la dimetilación de OTMA aumenta en el post-mortem,

es en las familias *Gadidae*, *Myctophidae*, *Thunnidae* y *Scombridae* (Sikorski y Kostuch, 1982).

La reducción del OTMA está generalmente asociada con géneros de bacterias típicos del ambiente marino (*Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* y *S. putrefaciens*), pero también es llevada a cabo por *Aeromonas* y bacterias intestinales de la familia *Enterobacteriaceae* (Stenberg y col., 1982).

3.3. METODOS DE EVALUACION DEL DETERIORO DEL PESCADO.

Siendo el pescado fresco de alta vulnerabilidad, como rubro alimentario también significa que si las condiciones de mercadeo se interrumpen o salen de lo normal, el pescado que no puede venderse dentro de su vida útil estimada se deteriora y de esta manera debe ser descartado. Esto es particularmente problemático para el pescado que no lleva ningún tipo de preservación y que a temperaturas tropicales tiene solo pocas horas de vida útil en almacenamiento cuando llega a la fase del comercio minorista. En muchos casos, si no se vende hoy, no podrá ser consumido mañana (FAO, 2001).

Los métodos para evaluar la calidad en el pescado fresco pueden ser divididos en dos categorías: sensorial e instrumental, sin embargo, para la evaluación del pescado congelado los métodos más utilizados son el recuento de aeróbios mesófilos (RAM), determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT) y determinación de trimetilamina (TMA) (FAO, 1998).

3.3.1. Recuento de aeróbios mesófilos (RAM).

Parámetro aplicable a productos pesqueros en general (Chile, 2006 a).

En Chile, los productos pesqueros de exportación se les debe realizar este análisis microbiológico a dos temperaturas de incubación, 30 °C y 35 °C (Chile, 2006 a).

El crecimiento bacteriano es la principal causa del deterioro del pescado; por lo tanto, es lógico usar el recuento bacteriano como un índice de calidad (Sikorski, 1990).

El recuento total de bacterias en placa es un método útil para obtener una idea del grado de frescura o pronta alteración de los alimentos, dependiendo de la cantidad de bacterias presentes. La mayoría de los alimentos deben ser considerados como inadecuados para el consumo cuando contienen un gran número de microorganismos, aun cuando estos microorganismos no sean conocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento (Thatcher y Clark, 1973).

La presencia de microorganismos aerobios mesófilos en los alimentos puede ser relacionada directamente con la manipulación, el estado de frescura o de descomposición del producto y la temperatura de conservación del producto. Un número relativamente bajo de estas bacterias no es sinónimo de buena calidad bacteriológica del alimento, ya que puede contener microorganismos que producen enterotoxinas o son patógenos (Venegas y col., 1990).

Las bacterias aerobias mesófilas, pueden ser consideradas generalmente como organismos indicadores, aunque representan una medida mucho menos precisa y fiables del peligro de intoxicación alimentaria que otros indicadores. Los recuentos elevados de bacterias mesófilas, a menudo están constituidos por la microflora normal o quizás indican una alteración incipiente del alimento y no un peligro potencial para la salud del consumidor (Thatcher y Clark, 1973).

Las bacterias mesófilas son aquellas que se desarrollan entre 20 °C y 40 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento entre 30 °C y 40 °C. Si bien, la mayoría de las bacterias patógenas para el hombre son parte de la flora aeróbica mesófilas, no existe una relación directa entre ellas y la posible presencia de microorganismos de importancia para la salud pública (Venegas y col., 1990).

La aplicación de este método se basa fundamentalmente en que, si el recuento es efectuado luego de un profundo conocimiento de la manipulación antes del muestreo (temperatura, empaque y otros), puede proporcionar una medida comparativa del grado general de contaminación bacteriana e higiene aplicada (FAO, 1998).

3.3.2. Determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT).

Este método es aplicable a productos pesqueros en general y es el más ampliamente utilizado en la evaluación de su calidad (Chile, 2006 b).

La determinación de NBVT en Chile para productos hidrobiológicos, se realiza según la técnica descrita en la Norma Chilena 2668, oficial 2001.

En el músculo de especies marinas existen compuestos nitrogenados no proteicos que se usan como índices de calidad, estos corresponden a contenido de bases volátiles totales, OTMA y TMA (Robles y col., 2003). El contenido de TMA y NBVT aumenta al producirse deterioro por acción bacteriana o enzimática y estos son usados como índices de calidad en productos marinos (Liston y col., 1976; Ben-Gigirey y col., 1999; Baixas-Nogueiras y col., 2001). También son ampliamente utilizados como índices de frescura la DMA y el NH₃ (Pérez-Villareal y Pozo, 1990).

El NBVT incluye la medición de TMA (producida por deterioro bacteriano), DMA (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación), NH_3 (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros (FAO, 1998).

En el bacalao y en otros gádidos, hasta que ocurre el deterioro, la TMA constituye la mayor parte de las denominadas bases volátiles totales; BVT (ó NBVT). Sin embargo, en el pescado deteriorado el suministro de OTMA decae, la TMA alcanza su máximo nivel y los niveles de NBVT continúan incrementando debido a la formación de NH_3 y aminas volátiles (FAO, 1998).

Este método tiene la ventaja de ser simple de realizar, sin embargo, no puede ser usado como un indicador de frescura, debido a que en las etapas iniciales en hielo los valores de NBVT permanecen constantes o disminuyen levemente para luego aumentar con el inicio del crecimiento rápido de los microorganismos (FAO, 1998; Gopakumar, 2000).

De acuerdo con la FAO el límite de aceptabilidad de NBVT es de 20-35 mg/100g de producto, mientras que el Reglamento Sanitario de los Alimentos considera entre 30-70 mg/100gr límite aceptable dependiendo de la especie (Chile, 2003), además el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) establece para productos de exportación como el salmón atlántico (*Salmo salar*) 35mg/100g y de 25mg/100g para *Sebastes sp.* (Chile, 2006 c).

3.3.3. Determinación de trimetilamina (TMA).

Este método es aplicable a productos pesqueros crudos y secos salados (Chile, 2006 b).

La TMA es una amina volátil, generalmente asociada con el olor típico a pescado, del pescado en deterioro. Su presencia en el pescado en deterioro es debido a la reducción bacteriana del OTMA, el cual está naturalmente presente en el tejido vivo de muchas especies de pescados marinos (Dalgaard, 1993; Pons-Sánchez-Cascado, 2005).

La TMA es principalmente generado post-mortem por la reducción bacteriana de OTMA. Siendo considerada como índice de frescura en el pescado (Pérez-Villareal y Pozo, 1990). El OTMA puede también generar DMA y FA a través de la acción de dimetilasa, el OTMA está presente en el músculo, piel, y los órganos viscerales de algunos pescados. Generalmente, la actividad de OTMAasa en las vísceras es más alta que en los tejidos del músculo (Rey-Mansilla y col., 2002).

La acción bacteriana es prevenida durante la congelación. Por lo tanto, ninguna producción bacteriana de OTMA a TMA ocurre, haciendo de la TMA un índice de historia previa a la congelación (Mills, 1975). La TMA con respecto a la determinación del número de bacterias refleja más acertadamente el grado de deterioro (según pruebas organolépticas) ya que filetes de alta calidad cortado con un cuchillo contaminado puede tener altos recuentos bacterianos. Sin embargo, en este caso las bacterias no han tenido la oportunidad de causar deterioro, de este modo los niveles de TMA tienen que ser forzosamente bajos (FAO, 1998).

En Chile, la determinación de TMA se basa en la norma Chilena 2657, oficial 2002.

La determinación de TMA tiene como ventaja, respecto al RAM que puede ser realizado mucho más rápido. Las mayores desventajas de este análisis radica en que, no refleja los estadios primarios de deterioro y sólo es confiable en ciertas especies de pescados (FAO, 1988).

El OTMA constituye una parte característica e importante del tejido muscular y más específicamente de la fracción de nitrógeno no proteico del pescado. Sólo las especies marinas contienen esta sustancia, de modo que esta prueba no puede aplicarse a especies de agua dulce (Connell, 1978).

Durante el almacenamiento en hielo, el OTMA es reducido a TMA por la acción de enzimas bacterianas y aumenta progresivamente a partir de los 8 días de almacenamiento en hielo. Estas enzimas bacterianas, en su mayoría, pertenecen a géneros que normalmente se encuentran en el ambiente marino (*Alteromonas*, *Photobactrium*, *Vibrio* y *Shewanella*), pero también es llevada a cabo por bacterias intestinales (Enterobacterias) (FAO, 1998).

Considerando los antecedentes expuestos, se planteó la siguiente hipótesis:

- Realizar la incubación de pescado congelado a 30 °C y 35 °C arroja distintos recuentos de bacterias mesófilas.

Los objetivos del trabajo fueron:

Objetivo general

- Determinar diferencias estadísticas entre los recuentos de aerobios mesófilos de muestras de pescado congelado, incubadas a 30 °C y 35 °C.

Objetivos específicos

- Determinación de la variación en la producción de trimetilamina y su correlación con el recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en muestras de filetes de pescado congelado y pescado entero congelado, incubadas a 30 °C y 35 °C.
- Determinación de la variación de la producción de nitrógeno básico volátil total y su correlación con el recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en muestras de filetes de pescado congelado y pescado entero congelado, incubadas a 30 °C y 35 °C.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIALES

Esta investigación se realizó con 110 muestras (cada muestra son 5 submuestras) de filetes de pescado y pescado entero congelado de distintas especies (salmones 54,5%, trucha 30% y otros 15,5%), provenientes de empresas productoras de la zona. Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Alimentos del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile, entre Diciembre del 2001 y Agosto del 2005. Estos registros contienen; recuento de bacterias aerobias mesófilas viables (RAM) incubadas a 30 °C y 35 °C, nitrógeno básico volátil total (NBVT) y trimetilamina (TMA).

4.2. METODOS

4.2.1 Análisis de laboratorio

No hubo variación en los equipos utilizados para la realización de los análisis indicados, ni en el grupo de trabajo.

Cada una de las muestras fue sometida a los siguientes análisis:

Microbiológico RAM a 30 °C: Basado en el método 2 (en superficie) de la ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). Incubación 72 hrs. a 30 °C ± 1 °C.

Microbiológico RAM a 35 °C: Basado en la Norma Chilena 2659, Oficial 2002 (en profundidad). Incubación 48 hrs. a 35 °C ± 1 °C.

Químico NBVT: Basado en la Norma Chilena 2668, oficial 2001. Método con precipitación de proteínas.

Químico TMA: Basado en la Norma Chilena 2657, oficial 2002. Extracción de TMA con ácido tricloroacético.

4.2.2 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Microsoft Excel 2000 para la base de datos y su análisis se realizó con el programa estadístico Statistix 8.0. Mediante el cual se trabajó el resumen de la

estadística descriptiva para los 4 análisis de las muestras, además con el test Shapiro Wilk y el gráfico de Probabilidad Normal se determinó que los datos analizados no tienen una distribución normal, se transformaron los datos a la función de logaritmo₁₀ con este procedimiento tampoco se cumplió con los supuestos de normalidad por lo cual se utilizó el test no paramétrico, Wilcoxon Rank Sum test (para variables independientes), para medir las diferencias entre los recuentos bacteriológicos a 30 °C y 35 °C. Para medir la correlación entre los recuentos de bacterias aerobias mesofilas a 30 °C y 35 °C con sus respectivos valores de NBVT y TMA se utilizó la correlación de Pearson, donde

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}, \text{ con un nivel de significación } P < 0,05.$$

5. RESULTADOS

En la tabla 1 se observa que el recuento de aerobios mesófilos a 30 °C obtuvo mayores valores calculados que al realizar la incubación a 35 °C. Mediante el test de Wilcoxon se verificó que la diferencia encontrada es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para los recuentos bacterianos realizados a la misma muestra de pescado congelado. En promedio, a la temperatura de incubación a 35 °C se obtuvo un 24,98% del recuento realizado al incubar las muestras a 30 °C.

Tabla 1. Resumen estadística descriptiva para RAM 30 °C, RAM 35 °C, NBVT y TMA.

	RAM 30 °C (Ufc/g)	RAM 35 °C (Ufc/g)	NBVT (mg/100g)	TMA (mg/100g)
Media	41.871	10.461	12,581	0,3165
DE	142.281	82.322	2,0547	0,4965
C.V. %	339,81	786,98	16,332	156,89
Mínimo	125	125	5,5	ND
Mediana	2.050	150	12,15	0,21
1° cuartil	1.500	125	11,2	0,13
3° cuartil	18.000	2.900	13,83	0,35
Máximo	$2,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	20,1	7,64
Moda	1.500	150	11,2	0

*ND se asume 0 para propósitos de cálculos

Tabla 2. Correlación entre el recuento de aerobios mesófilos viables a 30 °C- 35 °C con nitrógeno básico volátil total y trimetilamina; correlación entre éstos últimos.

	RAM 30 ° C	RAM	RAM	NBVT
RAM 35 ° C	0,7740	TMA 0,1585	NBVT -0,0446	TMA -0,0522
P-valor	0,0000	P-valor 0,0000	P-valor 0,1389	P-valor 0,0833

$P < 0,05$ significativo

Además los recuentos bacterianos a 30 °C y 35 °C tienen una correlación de 0,774, la que es significativa ($p < 0,05$), por lo que al encontrar altos recuentos a 30 °C se esperará que a 35 °C también sean elevados (anexo 1).

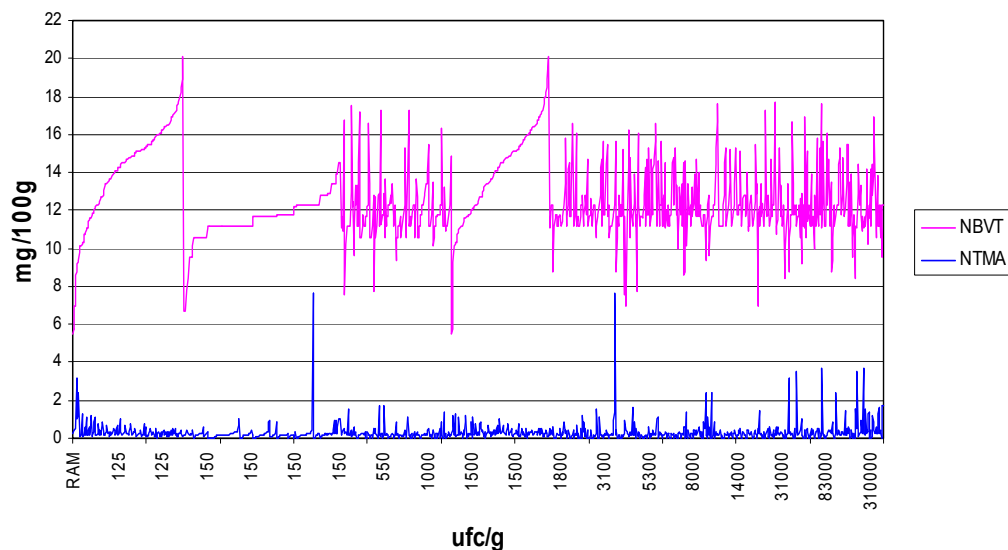


Gráfico 1. Producción de NBVT y TMA en muestras de pescado congelado, incubadas a 30 °C y 35 °C, en relación al recuento de bacterias aerobias mesófilas.

No se encontró correlación significativa ($p > 0,05$) entre el recuento de aerobios mesófilos (incubadas a 30 °C – 35 °C) y NBVT, siendo ésta de -0,0446, si se observó correlación, pero baja (0,15) entre la TMA y el recuento bacteriano, sin embargo, es significativa ($p < 0,05$). Tampoco se encontró correlación entre la producción de NBVT y TMA (-0,0522) (gráfico 2).

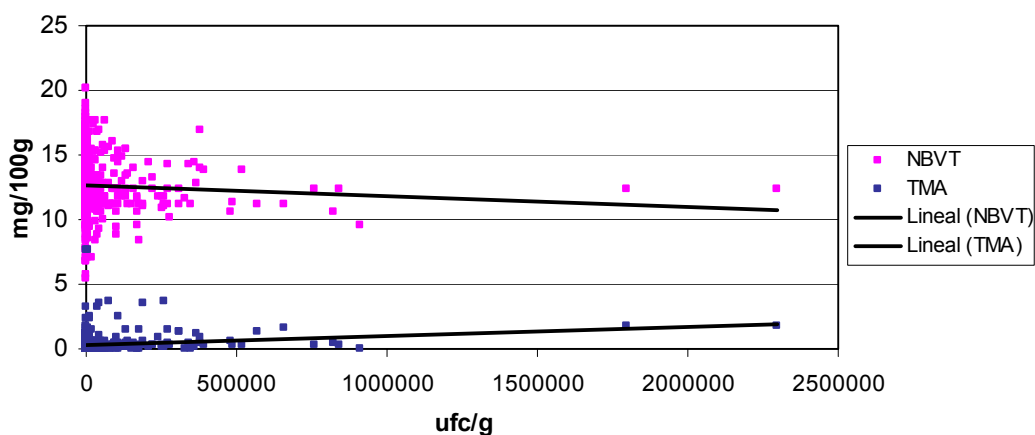


Gráfico 2. Dispersión y línea de tendencia de la producción de NBVT y TMA en muestras de pescado congelado, con relación al recuento de bacterias aerobias mesófilas.

6. DISCUSIÓN

El análisis microbiológico realizado en los filetes y pescado entero congelado confirma la presencia de recuentos bacterianos bajos $<1,0 \times 10^6$ ufc/g, lo que indica frescura del pescado analizado (Chile, 2006 a). Siendo las especies examinadas salmónes (54,5%), trucha (30%) y otros (15,5%). Los bajos recuentos se deben a las exigencias de mercados internacionales, por ser materia prima de exportación que deben cumplir con altos estándares de calidad (Chile, 2006 d).

Un total de 110 muestras de pescado congelados fueron analizadas. De éste el 99,82% tenían un recuento inferior a 10^6 ufc/g, nivel límite de aceptabilidad exigido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos y Sernapesca (Chile, 2003 y Chile, 2006 a). Rechazándose solo un 0,18% de las muestras, según estas exigencias y regulaciones chilenas, el pescado congelado que tiene recuentos menores de $1,0 \times 10^6$ ufc/g es considerado de calidad aceptable mientras que aquellos con recuentos superiores a este son considerados inaceptables. En este estudio ningún producto congelado excedió el nivel límite recomendado por el ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) para un producto de calidad aceptable. Todos los productos congelados probados son aceptados por el ICMSF ya que se establece como límite $1,0 \times 10^7$ ufc/g (ICMSF, 1978). Se debe advertir que los datos presentados aquí fueron obtenidos con una temperatura de incubación de 30 °C y 35 °C y las recomendaciones de la ICMSF están basadas en una temperatura de incubación de 25 °C. Esto se debe a que es considerada más valiosa como indicador de una alteración incipiente a causa de la naturaleza psicrófila de la flora alterante del pescado y los productos derivados de la pesca (ICMSF, 1981).

La media del recuento en placa a 30 °C fue de $4,2 \times 10^4$ ufc/g con un rango de $1,3 \times 10^2$ a $2,3 \times 10^6$ ufc/g y para el recuento a 35 °C una media de $1,0 \times 10^4$ ufc/g con rango entre $1,3 \times 10^2$ y $1,8 \times 10^6$ ufc/g en los productos congelados. Esto muestra una gran variabilidad en las muestras analizadas para cada producto (anexo 2). Debido a que la carga bacteriana en el pescado está influenciada por distintos factores como la zona de captura, especie (Shewan, 1977), época del año, condiciones de pesca, manipulación y procesado (Venkataraman y Sreenivasan, 1952; Wood, 1953; Shewan, 1961). Además la temperatura del agua influye significativamente en el número inicial y tipo de bacterias de la superficie del pescado. Generalmente pescados de aguas tibias, subtropicales y tropicales, poseen mayores recuentos bacterianos que los que proceden de frías (Shewan, 1961; FAO, 1998).

Al igual que la flora del agua de mar, el porcentaje de bacterias Gram negativas en peces es mayor que el de Gram positivas (Robina y col., 1964). Otro factor es la cantidad de flora bacteriana del contenido intestinal de peces recién capturados depende sólo del tiempo transcurrido desde la última comida, también varía según el grado de contaminación del alimento y del agua (Margolis, 1952). Además se encuentran recuentos muy elevados, por ejemplo 10^7 ufc/cm², en pescados capturados en aguas muy contaminadas (Liston, 1956; FAO, 1998). También los hábitos de vida influyen en la cantidad de bacterias en los peces. Los

peces demersales que se alimentan en el fondo albergan mayor cantidad de microorganismos en el mucus de la piel, en las branquias y en el tracto digestivo que los peces netamente pelágicos (Bedford, 1933).

En este estudio, los resultados obtenidos han arrojado que los recuentos en placa son más elevados cuando la incubación se realiza a 30 °C que cuando se incubaba a 35 °C. Esta diferencia también se encuentra reflejada en los resultados de carne de algunos mariscos (Wentz y col., 1983). El valor de las medias geométricas del recuento de aerobios en placa (APC) de 896 muestras de carne de cangrejo a 35 °C fue \log_{10} 5,15 y 5,72 a 30 °C; en 1.337 ostras desprovistas de cáscara, 5,59 a 35 °C y 5,95 a 30 °C; y para 358 almejas de valvas blandas los APC fue 2,83 a 35 °C y 4,43 a 30 °C. Esto también se observó en camarones crudos con cáscara y en las colas de langosta crudas congeladas, donde la media geométrica del APC en los camarones a 35 °C fue \log 5,48 y 5,90/g a 30 °C mientras que en la cola de las langostas era 4,62 a 35 °C y 5,15/g a 30 °C (Swartzentruber y col., 1980).

Además otros estudios que comparan recuento en placa a temperaturas de incubación diferentes han indicado que a baja temperatura 7 °C y 28 °C el rango es de 0,5 a 1,75 \log_{10} mayor que los obtenidos a más altas temperaturas entre 32 °C y 35 °C (Goepfert, 1976; Westhoff y Feldstein, 1976). En el análisis de productos refrigerados o congelados, esperarían un valor de recuentos de aerobios inferior en la temperatura de incubación más alta (35 °C) debido a la inhibición de organismos psicrotróficos (Foster y col., 1977). Siendo las bacterias psicrotrofas predominantes en pescado de aguas templadas, mientras que en el procedente de zonas tropicales son mayoritariamente mesófilas (Liston, 1980).

Esta diferencia se debería a que la mayoría de las bacterias pueden crecer en un amplio rango de temperatura. Sin embargo, sólo presentan un estrecho rango de crecimiento óptimo, delimita este rango una temperatura mínima de crecimiento y una máxima. Por debajo de la mínima la multiplicación se deteriora. Se sabe que la síntesis proteica es un proceso muy sensible a bajas temperaturas. Por sobre la temperatura máxima se produce muerte bacteriana debido a coagulación y denaturación de proteínas (Madigan y col., 1998). Durante la congelación, los microorganismos sufren múltiples lesiones que pueden causar su inactivación inmediata o retardarla (Löndahl y Nilsson, 1978). En el caso de las células crecidas a temperaturas de refrigeración son más lentas que aquellas crecidas a temperatura ambiente, expresan genes diferentes y son fisiológicamente distintas (Doyle y col., 1997).

Atendiendo a los diferentes requerimientos de temperaturas de los microorganismos según las temperaturas de incubación utilizadas se puede encontrar bacterias psicrotrofas que tienen su temperatura óptima cercano a los 25 °C y no crecen por sobre los 40 °C (Palumbo, 1986) y microorganismos mesófilos que se desarrollan entre 20 °C y 40 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento entre los 30 °C y 40 °C (Venegas y col., 1990).

En general, los resultados microbiológicos no proporcionan ninguna información sobre la calidad comestible y la frescura del pescado. Sin embargo, el número de bacterias específicas del deterioro está relacionado con el tiempo de duración remanente y esto puede ser predecido a partir del número de bacterias (FAO, 1998). La carencia de temperaturas de incubación estandarizadas justifica la necesidad de la consideración cuidadosa de varios

productos, su flora bacteriana, así como la necesidad de la metodología con guías realistas o normas establecidas. El hecho que estos productos tengan extremadamente altos recuentos hace necesario el punto de establecer guías microbianas requiriendo una base de datos extensa y conocimiento del producto involucrado (Foster y col., 1977).

Generalmente se acepta una frescura satisfactoria en peces congelados cuando tienen NBVT 30 mg N/100g (Pantaleón, 1969). Una media de NBVT de 12,58 mg/100g indica que los pescados analizados eran de alta calidad (Tabla 1). Según lo visto anteriormente los límites de aceptabilidad de NBVT para los organismos fiscalizadores son muy superiores a los encontrados en las muestras analizadas 25-35 mg/100g para pescados de exportación (Chile, 2006 c).

Se encontró que entre el NBVT y el recuento de aerobios mesófilos a 30 °C – 35 °C no hay correlación significativa ($p > 0,05$). Lo que puede deberse al hecho que no solo es reflejo del deterioro bacteriano sino que también del autolítico (Botta y col., 1984).

Los niveles encontrados de TMA fueron muy inferiores a aquellos habitualmente considerados para el rechazo del pescado < 15 mg TMA/100 g de pescado. Las bajas concentraciones de TMA indican que la calidad microbiológica del pescado antes de la congelar era buena (0,32 mg/100g). Sin embargo, se han reportado incrementos en la TMA durante el almacenamiento en congelación a -18 °C y -25 °C por 12 meses (Kelleher y col., 1981; LeBlanc y col., 1988; Abdalla y col., 1989). Para el análisis de TMA en las muestras de pescado congelado se encontró en baja correlación (0,15) con relación al número de bacterias, pero significativa, lo que concuerda con la FAO quien establece una baja correlación entre la TMA y el número de bacterias, ya que la TMA es generada por acción de las bacterias del deterioro las que no representan la mayor proporción de la flora total, pero son capaces de producir grandes cantidades de compuestos relacionados con el deterioro como la TMA (FAO, 1998).

Uno de estos organismos específicos del deterioro, *Photobacterium phosphoreum*, genera aproximadamente 10-100 veces la cantidad de TMA producida por *Shewanella putrefaciens*, organismo que contribuye al deterioro más comúnmente conocido (Dalgaard, 1993). Sin embargo, la TMA tiene alta correlación con resultados de análisis sensoriales, por lo que sería un buen índice de la degradación del pescado por acción de estos microorganismos (Huidobro y Tejada, 1990). A pesar de esto, no es aplicable a todas las especies, sólo lo es para pescados que tengan el OTMA como precursor; el que es escaso en las especies de agua dulce (Herbard y col., 1982) por lo que no es un parámetro de elección como índice de deterioro (Huidobro y Tejada, 1990), ya que no podría aplicarse a estas especies (Connell, 1978).

Los niveles de TMA y NBVT determinados en el músculo de pescado fueron altamente variables para la TMA y relativamente homogéneas para el NBVT, siendo bajos, en relación a los niveles exigidos, 15 mg/100g y 30 mg/100g respectivamente (Chile, 2006 b y c). El contenido de TMA a lo largo del deterioro, presenta gran variabilidad entre las diferentes

especies marinas principalmente por las diferencias en el contenido inicial de OTMA que presentan en su músculo (Rodríguez y col., 1997).

En general, los contenidos mayores se encuentran en pescados elasmobranquios y los menores en peces planos y pelágicos. Además los peces pelágicos tienen su mayor concentración de OTMA en el músculo oscuro mientras que los demersales, peces de carne blanca, tienen el contenido más alto en el músculo blanco (Tokunaga, 1970). El contenido de TMA también muestra diferencias dentro de una misma especie según el modo de conservación y almacenamiento. Así pues, durante el almacenamiento aerobio se forman cantidades mayores de TMA que por ejemplo en el envasado al vacío o el almacenamiento en agua de mar refrigerada (FAO, 1997).

Conclusiones:

- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los recuentos de aerobias mesófilas incubadas a 30 °C y 35 °C, siendo mayor el recuento al realizar el recuento a 30 °C. Lo que indicaría que a 30 °C también se evidenció la flora nativa del pescado.
- Además entre el recuento de aerobias mesófilas a 30 °C y 35 °C hay una alta correlación 0,774 que es significativa ($p < 0,05$).
- Debido a la baja correlación (0,15) entre la producción de TMA en relación al número de bacterias mesófilas no sería un buen indicador de calidad higiénica del pescado, considerando también su alta variabilidad.
- Entre el recuento de aerobios mesófilos y NBVT no hay correlación significativa ($p < 0,05$), ya que refleja el deterioro autolítico y bacteriano.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdalla M A, I Hassan, A Shalaby, K Nabuib. 1989. Correlation between biogenic amines, chemical and stability of sea bream fish during storage at -18 °C. *Grasas y Aceites* 40, 406-412.

Baixas-Nogueiras S, S Bover-Cid, M Vidal-Carou, M Veciana-Nogués. 2001. Volatile and nonvolatile amines in mediterranean Hake as a Function of their storage temperature. *J Food Sci.* 66, 83-88.

Bedford R. 1933. Bacteriology and its relation to the preservation of fish. *Proc Fifth Pacific Sci Congr* 6, 3715.

Ben-Gigirey B, J M Baptista de Sousa, T G Villa, J Barros-Velazquez. 1999. Chemical changes and visual appearance of Albacore tuna as related to frozen storage. *J Food Sci* 64, 20-24.

Botta, J R, J T Lauder, M A Jewer. 1984. Effect of methodology on total volatile basic nitrogen (TVB-N) determination as an index of quality of fresh Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J Food Sci* 49, 734-736.

CHILE. 2003. Ministerio de Salud. Reglamento Sanitario de los Alimentos.

CHILE. 2006a. Ministerio de Economía. Sernapesca. Programa de laboratorios. Métodos de análisis microbiológicos para productos pesqueros de exportación (Norma técnica sección 7).

CHILE. 2006b. Ministerio de Economía. Sernapesca. Programa de laboratorios. Métodos de análisis químico para productos pesqueros de exportación (Norma técnica sección 2).

CHILE. 2006c. Ministerio de Economía. Sernapesca. Programa de control de producto final. Requisitos Generales para la Certificación Sanitaria de los Productos Pesqueros de Exportación (Norma técnica sección 1).

CHILE. 2006d. Ministerio de Economía. Sernapesca. Programa de control de producto final. Requisitos específicos para la certificación sanitaria de los productos pesqueros de exportación, de acuerdo con los mercados de destino (Norma técnica sección 2).

Connell J J. 1978. Control de la calidad del pescado. Acribia. Zaragoza. España.

Connell JJ, J M Shewan. 1980. Past, present, and future of fish science. *Advances in Fish Science and Technology*. Pp56-65. Farnham, Surrey, Fishing News Books. London

Dainty R H, B G Shaw, T A Roberts. 1983. Microbial and chemical changes in chill-stored red meats. In *Food Microbiology. Advances and Prospects*. Pp 151–178. Academic Press. London.

Dalgaard P. 1993. Evaluation and prediction of microbial fish spoilage. Ph. D. Thesis. The Technological Laboratory of the Danish Ministry of Fisheries and the Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.

Dalgaard P, L Gram, H H Huss. 1993. Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmosphere. *Int J Food Microbiol* 19, 283–294.

DiChristina T, E DeLong. 1994. Isolation of anaerobic respiratory mutants of *Shewanella putrefaciens* and genetic analysis of mutants deficient in anaerobic growth on Fe^{3+} . *J Bacteriol* 176, 1464-1474.

Doyle M, L Beuchat, T Montville. 1997. *Food microbiology. Fundamentals and frontiers*. p768. ASM Press. Washington D.C.

Ellis C, M Silva. 1997. Statistical classification of seafood quality. *J Assoc Off Anal Chem* 80, 1347-1359.

FAO. 1988. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Documento Técnico de Pesca. N° 29. Roma.

FAO. 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Documento Técnico de Pesca. N° 334. Roma.

FAO. 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Documento técnico de pesca N° 348. Roma.

FAO. 2001. Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable Utilización Responsable del Pescado. Roma.

Foster J F, J Fowler, J Dacey. 1977. A microbial survey of Various fresh and frozen seafood products. *J Food Protect* 40, 300-303.

Gram L, C Wedell-Neergaard, H H Huss. 1990. The bacteriology of spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *Int J Food Microbiol* 10, 303-316.

Goepfert J M. 1976. The aerobic plate count, coliform and *Escherichia coli* content of raw ground beef at the retail level. *J Milk Food Technol* 39, 175-178.

Gopakumar K. 2000. Enzymes and enzyme products as quality indices. *Seafood enzymes*. Pp 337-363. Marcel Dekker. New York.

Haard, N F. 1992. Technological aspects of extending product quality of seafood. *J Aqua Food Prod Technol* 1, 9-27.

Hebard, C E, G J Flick, R E Martin. 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. Pp 149-304. AVI. Westport. Connecticut. USA.

Huidobro A, M Tejada. 1990. Determinación analítica de los compuestos nitrogenados no proteicos en el músculo de pescado. Aplicación al control de calidad. *Rev Agroquim Tecnol Aliment* 30, 293-302.

Instituto Nacional de Normalización, INN. 2001. Determinación de Nitrógeno Básico Volátil Total. Chile (Norma Chilena Oficial 2668).

Instituto Nacional de Normalización, INN. 2002. Determinación de Microorganismos Aeróbios Mesófilos. Chile (Norma Chilena Oficial 2659).

Instituto Nacional de Normalización, INN. 2002. Determinación de Nitrógeno de Trimetilamina. Chile (Norma Chilena Oficial 2757).

INTEC, Corporación de Investigación Tecnológica. 1998. Documento de difusión opciones de gestión ambiental. Sector elaboración de productos del mar. CORFO. Chile.

International Commission on Microbiological Specification for Foods, ICMSF. 1978. Microorganism in foods. Their Significance and methods. 2nd ed. Toronto. Canadá.

International Commission on Microbiological Specification for Foods, ICMSF. 1981. Microorganismos en alimentos. Metodos de muestreo para analisis microbiologicos: Principios y aplicaciones especificas. Acribia. Zaragoza. España.

Jay J. 2000. Modern food microbiology. 6th ed. Gaithersburg. Maryland. USA.

Kelleher S D, E Buck, H Hultin, K Parkin, J Licciardello, R Damon. 1981. Chemical and physical changes in red hake blocks during frozen storage. *J Food Sci* 47, 65-70.

LeBlanc E L, R LeBlanc, I Blum. 1988. Prediction of quality in frozen cod (*Gadus morhua*) fillets. *J Food Sci* 53, 328-340.

Liston J. 1956. Quantitative variations in the bacterial flora of flatfish. *J Gen Microbiol* 15, 305.

Liston J, M Stansby, H Olcott. 1976. Industrial fishery technology. 2nd ed. Robert E. Krieger. New York. USA.

Liston J. 1980. Microbiology in fishery science. *Advances in Fish Science and Technology*. Pp 138-157. Fishing News Books. London.

- Löndahl G, T E Nilsson. 1978. Microbiological aspects of the freezing of meat and prepared foods. *Int J Refrig* 1, 53-56.
- Lundstrom R, L Racicot. 1983. Decomposition in foods. *J Assoc Off Anal Chem* 66, 1159-1163.
- Madigan M, J Martinko, J Parket. 1998. Brock Biología de los Microorganismos. 8^a Ed. Pearson Educación S.A. Madrid, España.
- Margolis L. 1952. Aerobic bacteria in the intestines and slime of the pike (*Essox lucius*) in Lake Monroe, Quebec. *Rev Can Biol* 11, 20.
- Mills A. 1975. Measuring changes that occur during frozen storage of fish. *J Food Technol* 10, 483-496.
- Mjelda A, N Urdahl. 1974. Latest results in technology of preserving and handling small pelagic fish for food and feed. Fishery Products. Pp 74–77, Fishing News Books. London.
- Morita R Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 39, 144-167.
- Murray C K, J M Shewan. 1979. The microbial spoilage offish with special reference to the role of psychrotrophs. Cold tolerant microbes in spoilage and the environment. Academic Press. Pp 117-136. London.
- Palumbo S A, R Jenkins, R Buchanan, D Thayer. 1986. Determination of irradiation D-values for *Aeromonas hydrophila*. *J Food Sci* 49, 189-191.
- Pantaleon J. 1969. Contrôle des produits de la pêche par le dosage de l'azote basique volatile total (ABVT). Halifax, Canadá.
- Parkin K L, H Hultin. 1982. Some factors influencing the production of dimethylamine and formaldehyde in minced and intact red hake muscle. *J Food Process Pres* 6, 73–97.
- Pérez-Villareal B, R Pozo. 1990. Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). *J Food Sci* 55, 678-682.
- Pons-Sánchez-Cascado S, M Vidal-Carou, A Mariné-Font, M Veciana-Nogués. 2005. Influence of the Freshness Grade of Raw Fish on the Formation of Volatile and Biogenic Amines during the Manufacture and Storage of Vinegar-Marinaded Anchovies. *J Agric Food Chem* 53, 8586-8592.
- Rey-Mansilla M M, C Sotelo, R Perez-Martin. 2002. TMAOase activity of European hake (*Merluccius merluccius*) organs: Influence of biological condition and season. *J Food Sci* 67, 3242–3251.

Reddy N, C Schreiber, K Buzard, G Skinner, D Armstrong. 1994. Shelf life of fresh tilapia fillets packaged in high barrier film with modified atmospheres. *J Food Sci* 59, 260–264.

Robina B, Scholes, J M Shewan. 1964. The present status of some aspect of marine microbiology. *Advances in Marine Biology*, Vol II. Academic Press. London.

Rodríguez C, T Masoud, M Huerta. 1997. Estudio de los principales productos de degradación de la trimetilaminaoxido en cuatro especies de pescado sometidas a refrigeración. *Alimentaria* 288, 131-135.

Shewan J M. 1961. The microbiology of sea water fish. *Fish as food* Vol I. G. Borgstrom. Academic Press. New York.

Shewan, J M. 1962. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. *Recent advances in food science* 1, 1167-193.

Shewan J M. 1977. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In *Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*. Pp. 51–66. Tropical Products Institute. London.

Sikorski, Z, S Kostuch. 1982. Trimethylamine N-oxide demethylase: its occurrence, properties, and role in technological changes in frozen fish. *Food Chem* 9, 213-222.

Sikorski Z. 1990. *Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*. p248. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida.

Sikorski Z, B Pan, F Shahidi. 1994. *Seafood Proteins*. Chapman and Hall. New York.

Sikorski Z, E Kolakowski. 2000. Endogenous enzyme activity and seafood quality: influence of chilling, freezing, and other environmental factors. *Seafood enzymes*. Pp 451-487. Marcel Dekker. New York.

Sotelo C, H Rehbein. 2000. TMAO- degrading enzymes. *Seafood enzymes*. Pp 167-190. Marcel Dekker. New York.

Spanggaard B, L Joergensen, L Gram, H Huss. 1993. Antibiotic resistance against oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture* 115, 195-207.

Stenberg, E, O Styrvold, A Stroem. 1982. Trimethylamine oxide respiration in *Proteus* sp. strain NTCH 153: electron transfer-dependent phosphorylation and L-serine transport. *J Bacteriol* 149, 22-28.

Surendran P, K Gopakumar. 1981. Selection of bacterial flora in the chlortetracycline treated oil sardine (*Sardinella longiceps*), Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) and prawn (*Metapenaeus dobsoni*) during ice storage. *Fish Technol* 18, 133–141.

Swartzentruber A, A H Schwab, A P Duran, B A Wentz, R Read. 1980. Microbiological Quality of Frozen Shrimp and Lobster Tail in the Retail Market. *Appl Environ Microbiol* 40, 765-769.

Thatcher F, D Clark. 1973. Análisis Microbiológico de los Alimentos. Pp 30- 48. Acribia. Zaragoza. España.

Tokunaga T. 1970. Trimethylamine oxide and its decomposition in the bloody muscle of fish. 1. TMAO, TMA and DMA contents in ordinary and bloody muscles. *Bull Jap Soc Sci Fish* 36, 502-509.

Veciana-Nogués M, A Mariné-Font, M Vidal-Carou. 1997. Biogenic Amines as Higienic Quality Indicators of Tuna. Relationships with Microbial Counts, ATP-Related Compounds, Volatile Amines, And Organoleptic Changes. *J Agric Food Chem* 45, 2036-2041.

Venegas N, E Marambio, M Insunza, A Soto, A Arrieta. 1990. Control microbiológico de alimentos, técnicas actualizadas y métodos acelerados. Editorial Santiago. Universidad de Chile. Chile.

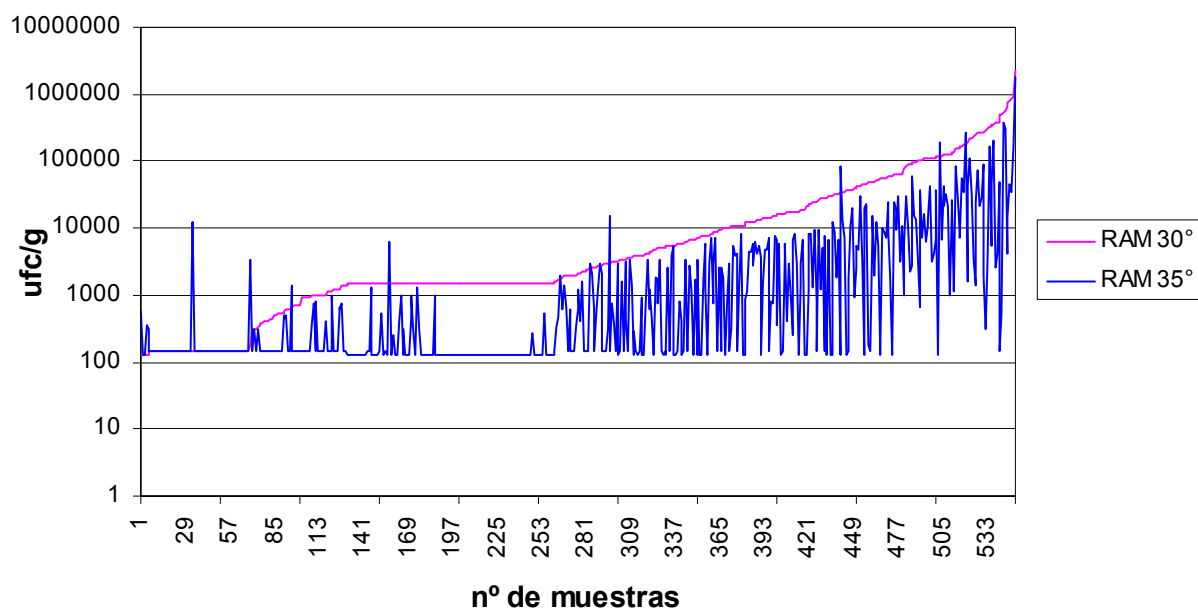
Venkataraman R, A Sreenivasan. 1952. A preliminary investigation of the bacterial flora of the mackerels of the West Coast. *Indian J Med Res* 40, 529:533.

Wentz B A, A Duran, A Swartzentruber. 1983. Microbiological quality of fresh blue crabmeat clams and oysters. *J Food Protect* 46 , 978-981.

Westhoff D, F Feldstein. 1976. Bacteriological analysis of ground beef. *J Milk Food Technol* 39, 401-404.

Wood E J. 1953. Heterotrophic bacteria in marine environment of Eastern Australia. *Australian J Marine and Freswater Research* 4, 160.

8. ANEXOS



Anexo1. Distribución del recuento de aerobios mesófilos viables a una temperatura de incubación de 30 °C y 35 °C para 550 submuestras de pescado congelado.

Anexo 2. Tabla de registros de los análisis realizados a 550 submuestras de pescado congelado. Análisis de Nitrógeno Básico Volátil Total (mg/100g), Trimetilamina (mg/100g) y Recuento de Aeróbios Mesófilos Viables (ufc/g) incubados a 30 °C y 35 °C.

Registros	RAM 30 °C	RAM 35 °C	NBV T	NTM A
1	125	125	16,5	0,12
2	125	300	17,5	0,12
3	125	570	13,7	0,13
4	125	350	17,2	0,15
5	125	125	15,5	0,3
6	150	150	11,2	0
7	150	150	11,2	0
8	150	150	11,2	0
9	150	150	11,2	0
10	150	150	11,8	0
11	150	150	12,2	0
12	150	150	12,3	0
13	150	150	12,3	0
14	150	150	11,7	0,11
15	150	150	11,7	0,11
16	150	150	10,6	0,12
17	150	150	11,2	0,12
18	150	150	11,7	0,12
19	150	150	11,7	0,12
20	150	150	11,8	0,12
21	150	150	11,8	0,12
22	150	150	11,2	0,13
23	150	150	11,2	0,13
24	150	150	11,2	0,13
25	150	150	11,8	0,13
26	150	150	12,3	0,13
27	150	150	6,7	0,14
28	150	150	11,2	0,14
29	150	150	11,2	0,14
30	150	150	11,7	0,14
31	150	150	12,8	0,14
32	150	150	11,2	0,15
33	150	150	11,2	0,15

34	150	150	11,7	0,15
35	150	150	6,7	0,17
36	150	150	11,8	0,17
37	150	150	12,3	0,17
38	150	150	9,5	0,18
39	150	150	11,7	0,18
40	150	150	11,8	0,18
41	150	150	12,3	0,18
42	150	150	10,6	0,19
43	150	150	11,2	0,2
44	150	150	11,8	0,2
45	150	150	11,8	0,2
46	150	12000	11,2	0,21
47	150	150	12,3	0,22
48	150	150	13,4	0,22
49	150	150	12,8	0,23
50	150	150	12,9	0,23
51	150	150	13,9	0,23
52	150	150	8,4	0,24
53	150	150	11,7	0,24
54	150	150	12,3	0,25
55	150	150	12,3	0,25
56	150	150	11,2	0,26
57	150	150	10,6	0,27
58	150	150	11,7	0,27
59	150	150	11,2	0,28
60	150	150	11,2	0,28
61	150	150	9,5	0,29
62	150	150	10,6	0,29
63	150	150	7,8	0,39
64	150	150	11,2	0,41
65	150	150	11,7	0,82
66	150	150	13,4	0,95
67	150	150	14,5	0,99
68	150	150	14,5	1,04
69	180	3300	11,7	0,23
70	300	150	11,2	0,13

71	300	150	11,2	0,13
72	300	300	11,2	0,22
73	310	150	12,2	0,15
74	330	300	11,2	0,13
75	350	150	11,2	0
76	390	150	11,2	0,25
77	390	150	10,6	0,27
78	400	150	11,7	0
79	400	150	11,2	0,21
80	400	150	11,2	0,35
81	400	150	12,2	0,38
82	450	150	10,6	0,14
83	450	150	11,2	0,16
84	500	150	12,8	0
85	500	150	12,8	0,15
86	500	150	10,6	0,29
87	530	150	11,2	0,17
88	550	150	11,8	0
89	550	150	11,8	0,18
90	550	500	12,9	1,76
91	560	440	10,6	0,14
92	600	1400	12,3	0,1
93	600	150	12,3	0,12
94	600	500	11,2	0,18
95	600	150	11,7	0,21
96	670	150	12,3	0,17
97	700	150	11,2	0
98	700	150	10,6	0,13
99	700	150	11,2	0,15
100	700	150	10,6	0,26
101	710	150	11,7	0,16
102	900	150	11,2	0,15
103	900	150	12,3	0,16
104	900	150	12,3	0,17
105	900	150	12,3	0,36
106	950	150	10,6	0
107	950	150	12,9	0,27
108	1000	800	11,2	0
109	1000	150	12,3	0,14
110	1000	390	10,6	0,16
111	1000	150	11,2	0,18
112	1000	410	13,4	0,18

113	1000	750	10,6	0,19
114	1000	150	11,8	0,2
115	1000	150	12,9	0,21
116	1000	150	13,4	0,21
117	1000	150	13,4	0,26
118	1100	1000	11,8	0
119	1100	150	11,2	0,12
120	1100	150	11,8	0,16
121	1100	150	11,2	0,18
122	1200	150	11,2	0
123	1200	640	11,2	0
124	1200	150	10,6	0,17
125	1200	600	11,7	0,24
126	1200	150	10,1	0,42
127	1400	125	14,9	0,16
128	1400	150	11,7	0,17
129	1400	750	11,2	0,17
130	1400	150	11,7	0,31
131	1500	125	16	0
132	1500	150	11,7	0
133	1500	340	13,3	0
134	1500	1300	11,2	0
135	1500	6400	12	0
136	1500	125	13,7	0,08
137	1500	125	17,6	0,08
138	1500	125	15,1	0,09
139	1500	125	15,8	0,1
140	1500	125	15,9	0,1
141	1500	125	18,9	0,1
142	1500	540	17,3	0,1
143	1500	125	11,8	0,11
144	1500	125	15,5	0,11
145	1500	1300	13,2	0,11
146	1500	125	10,3	0,12
147	1500	125	15,4	0,12
148	1500	125	16,4	0,13
149	1500	125	10,1	0,14
150	1500	125	11,1	0,14
151	1500	125	14,1	0,14
152	1500	150	11,7	0,14
153	1500	125	10,3	0,15
154	1500	125	10,8	0,15

155	1500	125	15,05	0,15
156	1500	125	15,75	0,15
157	1500	125	16,91	0,15
158	1500	125	15,2	0,16
159	1500	125	14,8	0,17
160	1500	125	14,9	0,17
161	1500	125	15,1	0,17
162	1500	1000	12,3	0,17
163	1500	125	10,7	0,18
164	1500	125	11,9	0,18
165	1500	125	12,4	0,18
166	1500	960	13,7	0,18
167	1500	125	11,6	0,19
168	1500	125	13,1	0,19
169	1500	125	11,1	0,2
170	1500	125	12,2	0,2
171	1500	125	12,7	0,2
172	1500	125	15,42	0,2
173	1500	125	15,6	0,2
174	1500	125	16,04	0,2
175	1500	125	16,8	0,2
176	1500	125	12,3	0,22
177	1500	125	13,5	0,22
178	1500	125	15,1	0,22
179	1500	125	18	0,22
180	1500	150	11,2	0,22
181	1500	150	11,2	0,22
182	1500	125	14,5	0,23
183	1500	125	14,1	0,24
184	1500	400	12,3	0,24
185	1500	550	11,7	0,24
186	1500	125	5,5	0,25
187	1500	125	15,1	0,25
188	1500	125	17,1	0,25
189	1500	125	18,5	0,25
190	1500	125	13,4	0,26
191	1500	125	14,3	0,26
192	1500	125	14,7	0,26
193	1500	125	18	0,26
194	1500	125	13,5	0,27
195	1500	125	13,8	0,28
196	1500	125	14,5	0,29

197	1500	125	16,4	0,29
198	1500	150	11,8	0,29
199	1500	125	14,7	0,3
200	1500	125	14,9	0,3
201	1500	125	15,1	0,3
202	1500	125	16	0,3
203	1500	125	17,3	0,3
204	1500	125	13,4	0,31
205	1500	125	14,9	0,31
206	1500	125	14,3	0,32
207	1500	125	16,5	0,32
208	1500	125	16,5	0,33
209	1500	990	12,7	0,33
210	1500	125	14,5	0,34
211	1500	125	14,9	0,34
212	1500	125	16	0,35
213	1500	125	16,2	0,35
214	1500	125	13,7	0,36
215	1500	125	16,2	0,36
216	1500	125	16,6	0,36
217	1500	125	14,8	0,37
218	1500	125	15,7	0,37
219	1500	125	16,1	0,37
220	1500	125	16,4	0,37
221	1500	125	13,6	0,38
222	1500	125	14,6	0,38
223	1500	310	12,5	0,38
224	1500	330	13,3	0,38
225	1500	300	13	0,39
226	1500	125	5,8	0,4
227	1500	125	15,5	0,4
228	1500	125	16,3	0,4
229	1500	250	12,1	0,4
230	1500	125	11,4	0,42
231	1500	125	16,9	0,42
232	1500	125	13,9	0,43
233	1500	125	18,2	0,45
234	1500	125	14	0,46
235	1500	125	15,1	0,46
236	1500	125	14,1	0,49
237	1500	125	17	0,5
238	1500	125	17,2	0,5

239	1500	270	16,8	0,5
240	1500	125	15	0,51
241	1500	125	15,9	0,52
242	1500	125	15,5	0,53
243	1500	480	12,7	0,55
244	1500	125	14,8	0,61
245	1500	125	13,4	0,65
246	1500	125	14,1	0,67
247	1500	125	14,5	0,67
248	1500	125	12,3	0,75
249	1500	125	14,8	0,75
250	1500	125	12,7	0,78
251	1500	125	15,2	0,81
252	1500	125	11,6	0,83
253	1500	125	12,7	0,84
254	1500	125	12	0,89
255	1500	125	14,3	1
256	1500	125	11	1,13
257	1500	125	12,1	1,15
258	1500	125	9,3	1,2
259	1500	125	11,6	1,2
260	1500	125	10,2	1,25
261	1600	340	12,3	0,15
262	1600	150	12,3	0,25
263	1700	460	11,2	0
264	1700	1900	11,2	0
265	1800	620	11,7	0,14
266	1800	700	11,2	0,14
267	1900	1400	11,2	0,12
268	1900	650	11,7	0,16
269	1900	610	13,4	0,25
270	1900	150	12,3	0,82
271	2000	150	11,7	0
272	2000	350	14,5	0,14
273	2000	150	12,3	0,27
274	2000	150	11,2	0,31
275	2100	600	12,8	0,12
276	2100	1200	16,3	0,14
277	2100	400	16,6	0,18
278	2200	1600	12,3	0,47
279	2300	150	11,8	0,13
280	2300	150	11,7	0,28

281	2400	150	11,7	0
282	2400	150	11,2	0,66
283	2500	600	12,3	0
284	2500	2100	11,7	0
285	2500	2900	11,2	0
286	2600	150	11,2	0,33
287	2600	460	12,8	0,55
288	2700	1200	11,8	0
289	2800	2100	11,7	0
290	2800	2900	11,2	0
291	2800	150	11,8	0,14
292	2900	150	12,3	0,12
293	3000	15000	11,8	0
294	3000	150	12,8	0,13
295	3000	150	10,6	0,22
296	3000	300	11,2	1,56
297	3100	750	11,2	0,11
298	3200	125	15,5	0,13
299	3200	150	12,3	0,15
300	3200	3000	14,3	0,15
301	3200	390	11,8	0,26
302	3400	3100	15,6	0,14
303	3400	150	10,6	0,21
304	3400	1600	11,2	0,21
305	3400	150	12,3	7,64
306	3500	430	10,6	0
307	3600	150	11,2	0,16
308	3700	3500	11,7	0
309	3700	1400	12,3	0,13
310	3800	125	15,2	0,11
311	3900	280	7,6	0,3
312	3900	150	11,7	0,97
313	4000	125	16,2	0,12
314	4000	125	14,5	0,13
315	4000	900	11,7	0,22
316	4000	150	11,7	0,38
317	4000	125	7	0,45
318	4100	800	10,6	0,35
319	4200	3400	11,7	0,14
320	4300	610	12,4	0,21
321	4400	1200	11,8	0,51
322	4500	470	7,7	0,3

323	4700	125	16,1	0,11
324	4900	1800	11,7	0,21
325	5000	1700	11,6	0
326	5000	3300	12,3	0
327	5000	750	11,8	0,1
328	5100	150	12,8	0,12
329	5100	125	14,3	0,2
330	5200	150	11,2	0,1
331	5300	125	15,3	0,6
332	5400	150	11,7	0,12
333	5400	2500	11,2	0,29
334	5500	3800	14,4	0,14
335	5500	125	16,6	0,2
336	5500	125	15,6	0,22
337	5500	5400	14,7	0,29
338	5700	150	11,2	1,05
339	5700	800	13,9	1,14
340	5800	125	12,3	0,19
341	5800	400	11,2	0,3
342	6000	150	12,3	0,13
343	6100	3400	11,2	0,21
344	6200	150	11,1	0,38
345	6600	2300	11,2	0
346	6700	2800	11,7	0
347	6800	1200	12,3	0
348	6800	125	15,1	0,19
349	6900	1700	11,8	0
350	7000	125	13,3	0,18
351	7400	125	14,5	0,19
352	7400	3400	11,2	0,28
353	7500	5700	14,6	0
354	7500	1700	8,8	0,58
355	7500	125	8,6	0,6
356	7600	1300	11,2	1,34
357	7700	125	10,1	0,12
358	7900	2900	12,3	0
359	8000	7200	13,2	0,29
360	8200	750	12,3	0,45
361	8600	3000	14,7	0,13
362	9000	7200	12,3	0,36
363	9000	150	14	0,6
364	9300	2600	12,3	0,12

365	9700	150	11,2	0
366	9700	2600	11,8	0,84
367	9900	1800	11,8	0,49
368	10000	850	11,7	0
369	10000	150	12,8	0,14
370	10000	3000	12,3	1,16
371	10000	125	9,4	2,37
372	11000	3800	11,7	0
373	11000	5400	11,2	0
374	11000	8100	12,3	0
375	11000	4300	11,7	0,14
376	11000	125	15,3	0,18
377	11000	150	12,3	0,25
378	11000	125	14,4	0,34
379	11000	320	9,6	0,64
380	11000	1200	12,3	0,9
381	12000	2700	12,8	0
382	12000	4400	11,2	0
383	12000	6000	11,2	0
384	12000	850	11,2	0,16
385	12000	4500	11,2	0,19
386	12000	6100	14,5	0,28
387	12000	1100	11,2	0,43
388	13000	3700	12,3	0
389	13000	4200	11,8	0,18
390	13000	125	15,2	0,2
391	13000	5300	11,8	0,35
392	14000	4900	11,7	0
393	14000	780	15,3	0,15
394	14000	4900	11,2	0,21
395	14000	7300	11,8	0,27
396	14000	1500	11,2	0,37
397	14000	150	13,4	0,44
398	15000	7900	11,8	0,15
399	15000	750	11,8	0,17
400	15000	6500	12,3	0,23
401	16000	350	11,2	0
402	16000	6000	12,8	0,15
403	16000	3600	12,8	0,21
404	16000	150	12,8	0,24
405	16000	5800	12,3	0,31
406	16000	125	12,6	0,32

407	17000	400	11,7	0
408	17000	3000	12,3	0
409	17000	1000	14	0,45
410	18000	2900	12,3	0,17
411	18000	6500	11,2	0,24
412	18000	8000	11,2	0,24
413	18000	125	12,8	0,36
414	18000	250	10,9	0,4
415	19000	1400	11,2	0
416	19000	3000	11,7	0,11
417	19000	6700	11,8	0,22
418	19000	125	12,5	0,42
419	21000	1200	11,8	0,22
420	21000	125	7	0,54
421	23000	8500	12,4	0,18
422	23000	8100	11,7	0,24
423	24000	1300	11,2	0
424	24000	800	17,3	0,15
425	24000	9700	11,2	0,32
426	25000	150	12,8	0,12
427	26000	9700	11,2	0
428	28000	5200	14,7	0,15
429	28000	1200	11,7	0,26
430	29000	7700	12,3	0
431	29000	125	17,7	0,27
432	29000	150	12,3	0,44
433	30000	6700	14,5	0,21
434	31000	12000	15,3	0,13
435	31000	125	11,5	0,58
436	31000	125	10,7	0,63
437	32000	9000	11,7	0,34
438	33000	6700	11,8	0
439	33000	1800	11,2	0,28
440	34000	83000	11,2	0
441	34000	125	9,8	0,44
442	35000	13000	11,2	0,19
443	35000	7300	13,4	0,28
444	36000	11000	16,7	0,22
445	36000	1700	11,8	0,26
446	36000	150	11,2	0,35
447	36000	125	8,8	3,21
448	37000	20000	13,4	0

449	39000	900	11,8	0
450	39000	2500	12,3	0,51
451	41000	5300	11,8	0
452	42000	4800	12,3	0,31
453	43000	31000	11,7	0,29
454	44000	2800	12,6	0,4
455	45000	20000	12,9	0,2
456	45000	125	9,2	1
457	46000	23000	12,3	0
458	47000	180	11,1	0,17
459	49000	150	10,6	0
460	49000	7700	13,4	0,46
461	49000	15000	15,1	0,55
462	50000	1900	11,4	0,32
463	51000	12000	12,3	0
464	52000	5500	11,8	0,15
465	54000	150	11,2	0
466	55000	125	13,9	0,5
467	56000	10000	11,2	0,14
468	56000	8600	11,7	0,43
469	57000	7200	10	0
470	59000	24000	12,8	0
471	60000	125	20,1	0,09
472	60000	9400	11,7	0,36
473	60000	1900	15,8	0,39
474	63000	25000	11,8	0,52
475	65000	19000	11,2	0
476	65000	31000	15,3	0,27
477	65000	9200	11,7	0,48
478	66000	3200	11,8	0
479	66000	11000	17,6	0,19
480	76000	5900	15,6	0,22
481	76000	1000	12,8	0,29
482	83000	31000	11,2	0,19
483	88000	11000	11,2	0,11
484	90000	2300	16,1	0,15
485	92000	2700	14,7	0,43
486	93000	13000	13,5	0,29
487	93000	60000	11,2	0,31
488	93000	15000	12,3	0,41
489	100000	7300	12,3	0
490	100000	36000	10,6	0,27

491	100000	3500	8,8	0,46
492	100000	680	9,4	0,85
493	110000	16000	11,2	0
494	110000	6800	15,3	0,16
495	110000	13000	12,3	0,16
496	110000	4100	14,8	0,19
497	110000	43000	12,3	0,26
498	110000	6200	11,7	0,27
499	110000	3200	14,4	0,4
500	110000	11000	11,7	2,43
501	120000	36000	11,8	0,18
502	120000	6700	14,8	0,24
503	120000	190000	12,9	0,31
504	120000	125	11,9	0,34
505	130000	22000	13,4	0,14
506	130000	43000	11,7	0,17
507	130000	33000	12,3	0,2
508	130000	19000	15,5	0,25
509	130000	1000	15,5	0,5
510	130000	21000	12,2	1,48
511	140000	1100	13,5	0,4
512	140000	27000	11,2	0,57
513	150000	85000	11,2	0
514	160000	29000	12,3	0,1
515	160000	8400	13,9	0,43
516	170000	55000	11,8	0,22
517	170000	7200	10,6	0,27
518	180000	34000	8,4	0
519	180000	270000	11,2	1,51
520	190000	1600	11,1	0,52
521	190000	43000	11,2	3,55
522	220000	110000	12,3	0,3
523	220000	32000	13,3	0,33
524	240000	3400	11,8	0,92
525	250000	1400	10,9	0,22
526	250000	25000	11,7	0,32
527	260000	29000	11,7	0,21
528	260000	22000	11,2	0,22
529	260000	74000	11,1	3,7
530	270000	91000	12,3	0,27
531	270000	2000	14,2	0,45
532	280000	300	10,2	0,31

533	310000	3400	12,3	1,37
534	330000	170000	11,6	0
535	340000	5500	14,2	0,45
536	350000	46000	11,2	0
537	360000	210000	14,4	0,12
538	370000	2500	12,8	1,17
539	380000	47000	16,9	0,41
540	380000	4300	13,9	0,82
541	480000	150	10,6	0,56
542	490000	550	11,3	0,27
543	520000	390000	13,8	0,29
544	570000	310000	11,2	1,29
545	660000	4300	11,2	1,67
546	760000	14000	12,3	0,25
547	820000	44000	10,6	0,44
548	840000	35000	12,3	0,25
549	910000	170000	9,5	0
550	2300000	1800000	12,3	1,71

9. AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos todos los que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo. Gracias por su buena disposición y su estímulo al Dr. Rafael Tamayo, profesor patrocinante y a la Srta. Mónica Sáez, Tecnólogo Médico del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria.

Además quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional, a mi hijo y amigos por su paciencia y cariño.